Gedruckt mit Unterstützung aus dem Jerome und Margaret Stonborough-Fonds

Die Lebendfärbung von Zellkernen

Von

Annie Paltauf

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität in Wien,
Nr. 281 der zweiten Folge)

(Vorgelegt in der Sitzung am 18. Oktober 1928)

Einleitung und Fragestellung.

Das Problem der vitalen Farbstoffaufnahme durch pflanzliche Zellen wurde durch die grundlegenden Untersuchungen von Pfeffer in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Die zahlreichen, dann in der Folgezeit unternommenen Versuche befaßten sich vor allem mit der Frage, ob und welche Farbstoffe überhaupt die Fähigkeit besitzen, in die lebende Zelle einzudringen. Daß für den Durchtritt der Farbstoffe die Plasmagrenzschichten von größter Bedeutung sein müssen, war klar, ferner auch, daß es sich um ein besonderes Permeabilitätsphänomen handeln müsse. Die Ansichten über die Art des Farbstoffdurchtrittes durch die Grenzschichten der lebenden Zelle sind verschieden, und es sei hier nur die von Overton vertretene Lipoidtheorie genannt, der jedoch Ruhland (2) entschieden entgegentrat.

Neben der Frage, welche Farbstoffe überhaupt die Fähigkeit haben, in die lebende Zelle einzudringen, erhob sich eine zweite, nämlich, welche Zellbestandteile von den Farbstoffen angefärbt, beziehungsweise wo diese gespeichert werden. Auch in dieser Richtung liegen verschiedene Untersuchungen vor. Neben der Speicherung der Farbstoffe im Zellsaft interessierte es besonders, ob und in welchem Ausmaß die lebenden Bestandteile der Zelle, Plasma und Kern, die Farbstoffe festhalten. Bei Wurzel- und Staubfadenhaaren, Blütenblättern und Stengeln verschiedener Pflanzen konnte Campbell sowohl ruhende als auch in Teilung begriffene Kerne vital färben. Mit gutem Erfolg wurden hiezu Dahliaviolett, Mauvein und Methylviolett verwendet, wobei ihm als Kriterium, ob die Zellen mit den gefärbten Kernen noch leben, die Plasmaströmung diente.

Auch für tierische Objekte wurden vitale Kernfärbungen beschrieben, wie schon Möllendorf erwähnt, seltener bei Metazoen, häufiger bei Protozoen, so von Brandt, Prowazek, Przesmycki und vielen anderen. Przesmycki verteidigte die Ansicht, daß Protozoenkerne vital gefärbt werden können. Später beschäftigte sich dann Rost eingehend mit dem Problem der vitalen Kernfärbung und kam zu dem Resultat, daß jede, auch die ganz blasse Kernfärbung nicht vital sei, sondern das Anzeichen einer Schädigung, die durch die Giftwirkung der Farbstoffe hervorgerufen sei. Anderseits gelang es Kite und Chambers, in einer Ringer-Janus-Grünlösung bei Spermatozyten und Spermien Kernnetzwerk, Chromosomen und Spindelfasern vital zu färben.

Für pflanzliche Objekte zeigte Ruhland (2), daß auch andere Farbstoffe, wie Chrysoidin und Prune pure, Plasma und Kern kräftig färben. Ferner beschreibt Küster (1) Färbungen des Zellsaftes und Kernes mit fluoreszierenden Farbstoffen, Erythrosin und Eosin, die nach der Ansicht Ruhland's nicht vital aufgenommen werden. Küster stellte ferner fest, daß bei der Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen auch die Transpiration der Pflanze von Bedeutung sei: nämlich, daß durch die Saugwirkung der Import der Farbstoffteilchen aus den Gefäßen in das angrenzende Parenchym beschleunigt werde. Gleicher Ansicht ist auch Ruhland. Später gelang es Küster (2) auch an nicht transpirierenden Pflanzenteilen deutliche Farbstoffaufnahme in lebende Zellen zu beobachten.

An Wurzelhaaren von *Hydrocharis Morsus ranae* gelang es Schaede (1), Bismarckbraun und Gentianaviolett vitale Kernfärbung zu erzielen, die er als

»sichere Vorboten des Todes« bezeichnet. Doch beobachtete er bei der Färbung mit Chrysoidin eine Speicherung im lebenden Plasma, aber keine Kernfärbung.

Kürzlich nun zeigte Küster (3), daß sich an Zwiebelschuppen, die vorher durch Nadelstiche verletzt wurden, mit Erythrosin und Eosin vitale Kern- und Plasmafärbungen erzielen lassen, aber nur in den an die Wunde angrenzenden Zellen.

Ebenso gelang es Gicklhorn (2), mit Erythrosinlösung durch Hinzufügen von geringer Menge von Essigsäure sehr zahlreiche und intensive Kernfärbungen an *Allium Cepa, Symphoricarpus racemosus, Spirogyra* und *Elodea* zu erzielen.

Die zahlreichen positiven Ergebnisse bezüglich vitaler Kern- und Plasmafärbung und vor allem die Untersuchungsn Küster's der letzten Jahre legten den Gedanken nahe, daß die Möglichkeit solcher Färbungen keineswegs so selten ist, wie man bisher angenommen hat. Daß hiehei nicht nur der Farbstoff, sondern auch die Art des Objektes von großem Einfluß ist, zeigte sich alsbald bei der Durchprüfung verschiedener Pflanzenarten. Weiters sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich nicht durch gewisse Beeinflussungen die vitale Kern- und Plasmafärbung beschleunigen, beziehungsweise in solchen Fällen, wo sie normal nicht gelingt, auch herbeiführen läßt. Es wurden nun Untersuchungen gemacht, deren Ziel es war, die Einflüsse von Salzlösungen, Alkohol, Äther, Temperatur und Licht auf die vitale Kernfärbung sowohl in den Zellen nahe von Wundstellen als auch in allen übrigen Zellen zu studieren.[1]

II. Versuchsmaterial und Methodik.

Zur Untersuchung wurden zuerst solche Pflanzen gesucht, welche über große farblose Zellen verfügten und so eine deutliche Beobachtung eventuell eingetretener Färbungen gestatteten. Störungen der Beobachtung durch Inhaltsstoffe in größerer Menge (Plastiden) oder durch gefärbten Zellsaft waren oft vorhanden. Besonders bewährten sich die Zwiebeln monokotyler Pflanzen, wie *Allium Cepa*, *Hyacinthus orientalis* und *Galanthus nivalis*. Weitere Versuche an farblosen Wurzelhaaren *(Triticum, Tradescantia)* hatten negativen Erfolg. Sonst wurden besonders monokotyle Pflanzen wegen ihrer regelmäßigen Zellform und leichten Beobachtungsmöglichkeit bevorzugt. Aber auch zahlreiche Farne und dikotyle Pflanzen wurden durchgeprüft; viele von ihnen mußten wegen Mangel eines genauen Einblickes und der damit verbundenen Gefahr einer Täuschung ausgeschaltet werden. Die Pflanzen mußten eine leichte Präparation gestatten, damit gleichzeitig möglichst viel Material unter gleichen äußeren Bedingungen aufgearbeitet werden konnte und außerdem die Schnitte oder abgezogenen Epidermisstreifen vollkommen intakt bleiben, damit nicht Verletzungen oder Schädigungen derselben zu

---

[1] Ein Teil der Rusultate wurde bereits in den Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. d. mathem.-naturw. Kl., 1927, Nr. 10, mitgeteilt.

An dieser Stelle sei es mir gestattet, meinem verehrten Lehrer, Herrn Hofrat Prof. Dr. H. Molisch, für die Überweisung des Themas als auch für seine Ratschläge und stete Förderung meiner Arbeit den herzlichsten Dank auszusprechen. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. G. Klein und Herrn Dozent Dr. J. Kisser für ihr Interesse und ihre Unterstützung meiner Arbeit.

unrichtigen Resultaten führen. Daher wurden zahlreiche Pflanzen auf ihre Verarbeitungsmöglichkeit hin untersucht und die geeignetsten von ihnen zur Untersuchung ausgewählt. Einzelne Versuche wurden noch mit Algen unternommen.

Zu den nun folgenden Versuchen über vitale Kernfärbung wurden sowohl saure als basische Farbstoffe verwendet, und zwar Erythrosin, Eosin und Dahliaviolett mit günstigem Erfolg, während Chrysoidin und Wasserblau wohl im lebenden Plasma, aber niemals im Kern gespeichert wurden. Die Farbstoffe wurden alle in destilliertem Wasser gelöst. Die geeignetste Konzentration für die fluoreszierenden Farbstoffe war 1 10.000, für Dahliaviolett 1 : 50.000. Die Farbstofflösungen wurden teils für sich allein auf die Objekte einwirken gelassen, teils wurden zu ihnen gewisse Salzzusätze, Alkohol oder Äther hinzugebracht, um deren Wirkung auf das Zustandekommen, beziehungsweise Beschleunigung der vitalen Färbung zu studieren. Bei den Salzen handelte es sich mit geringen Ausnahmen um Nitrate, also um das gleiche Anion, so daß die erzielten Färbungen auf Rechnung der Kationen zu stellen sind. Die Versuche wurden in kleinen Glasschalen, der photodynamischen Wirkung wegen im Dunkeln, bei gewöhnlicher Zimmertemperatur durchgeführt. Zur Feststellung des Lebendzustandes der Zellen nach der Färbung wurden die Materialien plasmolysiert und nach erfolgter Plasmolyse deplasmolysiert. Als Plasmolytikum gelangten meistens Rohrzuckerlösung und Brenner'sche Lösung zur Verwendung. Die Deplasmolyse wurde stets mit abgestuft verdünnten Lösungen durchgeführt.

III. Eigene Untersuchungen.

Allium Cepa (Zwiebeln).

Ganze Küchenzwiebeln wurden durch Nadelstiche verletzt und für 6 bis 7 Stunden in eine Erythrosinlösung 1 : 10.000 gelegt. Es zeigte sich nun übereinstimmend mit den Resultaten Küster's (3), daß eine vitale Farbstoffaufnahme stattgefunden hat. Die direkt an die Wunden angrenzenden Zellen hatten reichlich Farbstoff gespeichert, ließen aber keine Plasmolyse mehr zu und waren tot. Sie waren durch den Stich verletzt worden. Hingegen zeigten die an diese angrenzenden Zellen deutlich rosa bis rötlich gefärbte Kerne und ebensolches Plasma und ließen sich leicht und normal plasmolysieren.

Zwiebelschnitte in Farbstofflösung eingelegt, zeigten ein ganz ähnliches Bild. Am Rand des Schnittes konnte man nach einer Versuchszeit von $3^1/_2$ Stunden vereinzelt gefärbte Kerne bemerken, während der innere Teil vollständig ungefärbte Kerne in den Zellen zeigte. Je länger der Schnitt in der Erythrosinlösung verblieb, desto weiter nach innen schritt die Färbung fort, doch gingen dabei die am Rand gelegenen Zellen zugrunde. Die anderen Zellen konnten plasmolysiert werden. Es war deutlich zu beobachten, daß die vitale Färbung von der Wunde ausgeht, da die Farbstofflösung die

Kutikula nicht zu durchdringen vermag. Sicherlich ist die vitale Kernfärbung durch den Wundreiz günstig beeinflußt.

Die vitale Färbbarkeit der in der Nähe von Wunden gelegenen Zellen kann mit einer wenn auch nur geringfügigen und daher äußerlich gar nicht feststellbaren Schädigung zusammenhängen, anderseits ist es auch denkbar, daß infolge des Wundreizes eine Veränderung ihrer Permeabilitätsverhältnisse eintritt. Nun wissen wir aus den Untersuchungen von Hansteen, daß die Nährsalze selbst, einzeln freilich der Pflanze geboten, die Plasmagrenzschichten weitgehend verändern, und dann besonders auch die Permeabilitätsverhältnisse. Aus diesem Grund nun wurden Farbstofflösungen mit Zusätzen von Salzen des Mg, K, Ca, Na und Al verwendet. Bereits äußerst schwache Konzentrationen der Nitratlösungen brachten bei der vitalen Färbung des Kernes einen unverkennbaren deutlichen Einfluß hervor. Als Konzentrationen bei den Versuchsserien wählte ich 0·5-, 0·25-, 0·1-, 0·01-, 0·001-prozentige Lösungen. Speziell für *Allium Cepa* eigneten sich vor allem 0·5- und 0·25prozentige Lösungen, obwohl auch bei der schwachen Lösung von 0·001% ein deutlicher Unterschied gegenüber dem Kontrollversuch bestand. Sogar makroskopisch war die Färbung

Tabelle I.

Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung		Plasmolyse	Lebensdauer der Schnitte
	Parenchym	Epidermis		
Kontrolle	einzelne schwach gefärbte Kerne am Rand des Schnittes	keine gefärbten Kerne	regelmäßig	nach 2 Tagen Parenchymzellen tot, Epidermis intakt
0·5% $Mg(NO_3)_2$ (Versuchsdauer 2 Stunden)	Kerne stark rot, Plasma rosa	keine gefärbten Kerne	regelmäßig, mit zahlreichen Plasmafäden	
0·5% $Mg(NO_3)_2$	intensive Kernfärbung	intensive Kernfärbung	normal, Parenchym nicht geschädigt	nach 2 Tagen Epidermis lebend
0·25% $Mg(NO_3)_2$	Kerne stark gefärbt, Plasma farblos		normal, Parenchym teilweise geschädigt	
0·5% KNO_3	dunkelrot gefärbte Kerne	schwächere Färbung	regelmäßig	am dritten Tag nur Epidermis intakt
0·5% $Ca(NO_3)_2$	schwächer gefärbte Kerne, Plasma lichtrosa	lichtrote Kerne, Plasma farblos	regelmäßig	am zweiten Tag alle Zellen tot
0·5% $NaNO_3$	keine besonders starke Färbung der Kerne		regelmäßig	am dritten Tag die meisten Zellen lebend

der Schnitte deutlich zu bemerken, während an den Kontrollschnitten eine Färbung kaum sichtbar war.

Versuche mit Schnitten von *Allium Cepa*, die $3^1/_2$ Stunden hindurch in verschiedenen Erythrosinlösungen untergetaucht waren, zeigten folgende Resultate, die in Tabelle I zusammengestellt sind.

Bei diesen Versuchen (Tab. I) zeigte es sich, daß die Salze des Mg, K, Ca und Na einen stark begünstigenden Einfluß auf die vitale Kern- und Plasmafärbung haben, doch daß die Wirkung in der Reihenfolge der genannten Salze abnimmt. Was die Lebensdauer der gefärbten Schnitte betrifft, ist kein starker Unterschied zu verzeichnen. Die stärkste Schädigung war an jenen Schnitten zu beobachten, die mit einer $Ca(NO_3)_2$-Lösung behandelt wurden, denn die Zellen waren am zweiten Tage bereits alle tot. Plasmolyse war überall normal, bei Zusatz von $Mg(NO_3)_2$-Lösung durch zahlreiche feine Plasmafäden ausgezeichnet. Betont sei ferner, daß die vitale Kernfärbung in allen Zellen eingetreten ist.

Ferner wurden Versuche aufgestellt, wobei die Zwiebelschnitte zuerst $3^1/_2$ Stunden mit Salzlösung allein behandelt und erst dann in die Farbstofflösung, die mit einer Salzlösung gemischt war, übertragen wurden. Verwendet wurden auf die Permeabilität der Zelle antagonistisch wirkende Salze, um ihren Einfluß auf die vitale Kernfärbung zu beobachten (Tab. II).

Tabelle II.

Vorbehandlung	Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse	Lebensdauer der Schnitte
1% $Mg(NO_3)_2$	0·5% $Ca(NO_3)_2$	sehr intensive Kernfärbung	stark unregelmäßig; Deplasmolyse selten möglich	am folgenden Tag alle Zellen tot
1% KNO_3	0·5% $Ca(NO_3)_2$	starke Kern- und Plasmafärbung	normal; einzelne Parenchymzellen sind geschädigt	mit Ausnahme einiger Epidermiszellen alle Zellen tot
0·5% KNO_3	0·5% $Ca(NO_3)_2$	stark gefärbte Kerne	regelmäßig; nicht geschädigt	
0·5% $Mg(NO_3)_2$	0·5% $Ca(NO_3)_2$	noch stärker gefärbte Kerne	regelmäßig; gar nicht geschädigt	

Bei diesen Versuchen (Tab. II) zeigte es sich, daß die auf die Permeabilität der Zelle antagonistisch wirkenden Salze eine noch intensivere Kernfärbung hervorrufen. Es ist daher nicht wahrscheinlich, daß durch Hinzufügen von Salzen eine Permeabilitätsveränderung hervorgerufen wird, welche dann die vitale Kernfärbung begünstigt. Es sei auch erwähnt, daß die Lebensdauer dieser Schnitte bedeutend kürzer ist.

Eine kolossale Begünstigung der vitalen Kern- und Plasmafärbung bedingt der Zusatz einer $Al_2(SO_4)_3$-Lösung. In diesem Fall kann es sich nicht um eine Permeabilitätsveränderung handeln, sondern es muß ein anderer Faktor eine Rolle spielen, vielleicht eine kleine Irritation des Kernes. Die Versuchsdauer war bei derselben Konzentration wie bei den Nitratlösungen nur eine Stunde (siehe Tab. III).

Tabelle III.

Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
Erythrosin allein	keine Kernfärbung	normal
0·5% $Al_2(SO_4)_3$	Epidermis: keine gefärbten Kerne; Parenchym: Kerne dunkelrot, Plasma lichtrosa	normal, zahlreiche Plasmafäden
0·25% $Al_2(SO_4)_3$	Parenchym: tiefrote Kerne, Plasma rosa tingiert	regelmäßig; büschelig angeordnete Plasmafäden
0·1% $Al_2(SO_4)_3$	noch deutlich rot gefärbte Kerne, Plasma farblos	normal, Plasmafäden im Parenchym
0·01% $Al_2(SO_4)_3$	beinahe so starke Kernfärbung	regelmäßig
0·001% $Al_2(SO_4)_3$	Epidermis: Kern und Plasma farblos; Parenchym: Kerne deutlich rot, Plasma farblos, aber nur in einzelnen Zellen	regelmaßig, Plasmafäden

Um die schwächste Konzentration der $Al_2(SO_4)_3$-Lösung zu ermitteln, die noch einen Einfluß auf die vitale Kernfärbung ausübt, wurden folgende Versuche, wie Tab. IV zeigt, mit einer Dauer von 2 Stunden durchgeführt.

Tabelle IV

Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse	Anmerkung
0·005% $Al_2(SO_4)_3$	Epidermis: Kerne ungefärbt; Parenchym: Kerne rot, Plasma farblos	normal, starke Plasmafäden	
0·0025% $Al_2(SO_4)_3$	gleich starke Färbung	Protoplasten nach der Plasmolyse zugespitzt	
0·001% $Al_2(SO_4)_3$	schwache Kernfärbung	normal, zahlreiche Plasmafäden	
0·0001% $Al_2(SO_4)_3$	keine Kernfärbung	regelmäßig, viele Plasmafäden	nach 7 Stunden in Epidermis- und Parenchym Kernfärbung
0·00001% $Al_2(SO_4)_3$	keine Kernfärbung	normal, büschelig angeordnete Plasmafäden	kein Unterschied gegenüber Kontrollversuch

Sogar Konzentrationen von 0·001% $Al_2(SO_4)_3$-Lösung üben noch eine starke Wirkung auf die vitale Kernfärbung aus. Die Kerne waren sehr stark gefärbt, das Plasma lichtrosa, und dennoch konnten sie normal plasmolysiert werden. Typisch für die Plasmolyse bei $Al_2(SO_4)_3$-Lösung war das Auftreten zahlreicher feiner Plasmafäden.

Ferner beobachtete ich, daß Alkohol und Äther eine günstige Wirkung auf die Vitalfärbung der Kerne ausüben (siehe Tab. V). Die Kernfärbung ist im Vergleich zum Kontrollversuch viel deutlicher und zahlreicher wahrzunehmen, obgleich nicht so häufig als durch Hinzufügen von Salzlösungen. Ebenso wie bei den früheren Versuchen, ist die Versuchsdauer $3^1/_2$ Stunden.

Tabelle V

Konzentration des Zusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse	Lebensdauer der Schnitte
Kontrolle	einzelne gefärbte Kerne am Rand des Schnittes	normal	Parenchym nach 2 Tagen tot, Epidermis lebend
1% Alkohol	kein Unterschied gegenüber dem Kontrollversuch	normal	gleiche Lebensdauer wie beim Kontrollversuch
2% Alkohol	starke Kernfärbung in Parenchym und Epidermis	normal, Plasma an den konvexen Rändern der Zellsaftvakuole hervorgetreten und gefärbt	2 Tage hindurch Zellen unverändert, am dritten Tag einzelne Zellen tot
3% Alkohol	noch stärkere Kernfärbung	normal	2 Tage hinduch lebend
2% Äther	sehr intensive Kernfärbung	normal, aber langsamer eingetreten	nach 30 Stunden Zellen schon sehr geschädigt
3% Äther	Färbung ist gleich, Zahl der gefärbten Kerne größer	normal	kein Unterschied gegen 2% Äther

Durch Hinzufügen von 2% und 3% Alkohol und Äther wird die vitale Kernfärbung begünstigt, wenn auch nicht in demselben Maße wie durch Salzzusätze. Die Färbung ist sehr intensiv, ohne daß die Zelle irgendwie geschädigt erscheint; bei den Versuchen mit Äther ist die Lebensdauer der Schnitte etwas geringer. Tabelle VI zeigt Versuche mit Eosinlösung in der Konzentration 1 10.000. Versuchszeit ist $3^1/_2$ Stunden.

Auch hier haben die Salzlösungen eine starke günstige Wirkung auf die vitale Kernfärbung. Ein Unterschied im Vergleich zur Erythrosinfärbung liegt nur in der gerade umgekehrten Wirkung der KNO_3- und $NaNO_3$-Lösung. Während beim Erythrosinversuch

Tabelle VI.

	Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
1.	Kontrolle	keine Kernfärbung	normal
2.	0·5% $Mg(NO_3)_2$	Kerne rot, Plasma farblos, vor allem im Parenchym deutlich	normal, zahlreiche Plasmafäden
3.	0·5% KNO_3	Epidermis: Kerne lichtrosa, bedeutend schwächere Färbung	regelmäßig
4.	0·5% $Ca(NO_3)_2$	intensiv gefärbt wie bei $Mg(NO_3)_2$	normal
5.	0·5% $NaNO_3$	schwächere Färbung, doch stärker und zahlreicher als bei Versuch 3	regelmäßig

bei Zusatz einer $NaNO_3$-Lösung die schwächste Färbung der Kerne eintritt, ist der Einfluß beim Eosinversuch ein ganz kollossaler. Die Kernfärbung beim Eosinversuch ist immer etwas schwächer, verglichen mit der Erythrosinfärbung, was wohl auf die lichtere Farbe zurückzuführen ist.

Bei Versuchen mit Dahliaviolett (Tab. VII) treten im Gegensatz zu denen mit Erythrosin und Eosin auch ohne Hinzufügen von Salzlösungen häufig deutlich sichtbare Kernfärbungen auf. Dahliaviolett wurde in der Konzentration 1:50.000 bei einer Versuchsdauer von $3^1/_2$ Stunden verwendet.

Tabelle VII.

	Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
1.	Kontrolle	Parenchym: Kerne dunkelviolett gefärbt, Plasma licht getönt	normal
2.	0·5% KNO_3	Kernfärbung dieselbe, Plasma gänzlich ungefärbt; gefärbte Kerne im Parenchym zahlreicher als in der Epidermis	normal
3.	0·5% $Mg(NO_3)_2$	kein Unterschied gegenüber Versuch 2	normal, doch zahlreiche Plasmafäden
4.	0·5% $Ca(NO_3)_2$	Kerne lichtviolett gefärbt, schwächer als bei 1	normal
5.	0·5% $Na(NO_3)_2$	kein Unterschied zu Versuch 4	normal
6.	0·5% $Al_2(SO_4)_3$	keine vitale Kernfärbung. In einzelnen Zellen am Rand färbte sich der Zellsaft gelbgrün	Zellen mit gefärbtem Zellsaft waren unplasmolysierbar

Die verschiedenen Salzlösungen spielen bei diesen Versuchen keine so bedeutende Rolle, da mit der Farbstofflösung allein schon deutliche Färbungen erzielt wurden.

Hyacinthus orientalis (Zwiebeln).

Wie bei *Allium Cepa* wurden auch hier die Zwiebelschuppen verwendet, deren Epidermishäutchen sich leicht, ohne die Zellen irgendwie zu schädigen, abziehen läßt. Die Epidermiszellen haben eine regelmäßige Form, einen deutlich sichtbaren Kern und zeigen n bezug auf die vitale Kernfärbung ganz ähnliches Verhalten wie *Allium Cepa.* Die Versuche wurden mit Erythrosin bei einer Versuchsdauer von einer halben Stunde durchgeführt (siehe Tab. VIII).

Tabelle VIII.

Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
Kontrolle	keine Kernfärbung	regelmäßig
0·5% $Mg(NO_3)_2$	Kerne und Plasma stark gefärbt. Die Randschichten sind stark geschädigt	regelmäßig, an den Rändern der Zellsaftvakuole tritt das gefärbte Plasma hervor
0·1% $Mg(NO_3)_2$	Kern dunkelrot, Plasma lichter, manchmal farblos	regelmäßig; alle Zellen sind intakt
0·5% KNO_3	Kerne intensiv gefärbt schon nach 20 Minuten; Plasma ungefärbt	regelmäßig
0·5% $Na\,NO_3$	Kerne rosa, Plasma licht tingiert	größtenteils regelmäßig, kein vollständiges Loslösen des Protoplasten von der Zellwand
0·5% $Al_2(SO_4)_3$	sehr starke Färbung von Kern und Plasma	regelmäßig, zahlreiche Plasmafäden

Die intensivste Kernfärbung rufen $Mg(NO_3)_2$- und $Al_2(SO_4)_3$ Lösungen hervor; die Färbung tritt bereits nach sehr kurzer Zeit ein und ist in allen Zellen zu beobachten.

Vitale Kernfärbungen an dem Gewebe von Tulpen- und *Crocus*-Zwiebeln konnten wegen der großen Menge von Reservestoffen in den Zellen nicht genau beobachtet werden.

Galanthus nivalis (Zwiebeln).

Die vitale Kernfärbung wurde an Schnitten durch kleine Zwiebeln beobachtet, die eine Stunde hindurch in verschiedene Erythrosinlösungen gebracht worden waren. Resultate sind in Tab. IX zusammengestellt.

Tabelle IX.

Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
Kontrolle	keine Kernfärbung	regelmäßig
0·5% $Mg(NO_3)_2$	Parenchym: Kerne stark gefärbt, Plasma licht getönt; Epidermis: Kerne ungefärbt	regelmäßig, viele feine Plasmafäden
0·5% KNO_3	nur am Schnittrand deutliche Kernfärbung; Plasma in einigen Zellen gefärbt	regelmäßig
0·5% $NaNO_3$	Kerne äußerst schwach gefärbt und nur in wenigen Zellen	regelmäßig
0·5% $Ca(NO_3)_2$	Kerne lichtrosa	normal
0·25% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne dunkelrot, Plasma lichtrosa schon nach 20 Minuten	normal, in den Randzellen etwas unregelmäßig

Bei *Galanthus nivalis* wurde die intensivste und deutlichste Kernfärbung durch Hinzufügen einer $Al_2(SO_4)_3$-Lösung erzielt. In diesem Fall war der Eintritt der Färbung bedeutend rascher.

Tabelle X.

	Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
1.	Kontrolle	keine Kernfärbung	regelmäßig
2.	0·5% $Mg(NO_3)_2$	Kerne tiefrot, Plasma farblos, Chlorophyllkörner unverändert	normal, Protoplasten oft getrennt oder nur durch Plasmastränge verbunden. Plasma oft an der Zellensaftvaknole hervorgetreten
3.	0·5% KNO_3	keine so starke Färbung wie bei 2	normal, Protoplasten rund, keine Plasmafäden
4.	0·5% $Ca(NO_3)_2$	sehr schwache Kernfärbung; sonst kein Unterschied gegen 3	normal
5.	0·5% $Al_2(SO_4)_3$	Parenchym: tiefrote Kerne; Epidermis tot	nur einzelne Parenchymzellen plasmolysierbar
6.	0·25% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne dunkelrot, Plasma lichtrosa	Epidermis- und Parenchymzellen plasmolysierbar
7.	0·1% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne stark gefärbt, vor allem im Parenchym	regelmäßig, feine Plasmafäden

Agapanthus umbellatus (Blätter).

Blattstücke von *Agapanthus*, durch Nadelstiche verletzt, wurden für $3^1/_2$ Stunden in Dahliaviolettlösung 1 : 50.000 gebracht. Rund um die Wundstelle trat auch hier vitale Kernfärbung auf; die Kerne sind dunkelviolett gefärbt, das Plasma etwas lichter. In den Parenchymzellen erscheint das Plasma farblos, daher tritt die Kernfärbung noch deutlicher hervor. Plasmolyseform war regelmäßig. Mit Erythrosin konnte auf dem Weg der Verwundung keine vitale Kernfärbung erzielt werden.

Schnitte von der Blattunterseite wurden in Erythrosin- und verschiedene Salzlösungen gebracht und nach einer Stunde untersucht. Resultate zeigen Tab. X und XI.

Tabelle XI.

Versuchsdauer 3 Stunden.

	Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
1.	Kontrolle	Plasma lichtrosa, Kerne farblos	regelmäßig
2.	0·005% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne sehr stark gefärbt, Plasma ganz licht	schwach eingetreten, viele Zellen tot
3.	0·0025% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne stark gefärbt, oft auch Plasma	Protoplasten meist getrennt
4.	0·001% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne noch rot, Plasma sehr lichtrosa	regelmäßig
	0·0001% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne rosa, Plasma farblos	regelmäßig
6.	0·00001% $Al_2(SO_4)_3$	weder Kerne noch Plasma gefärbt	regelmäßig

Tabelle XII.

	Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
1.	Kontrolle	keine Kernfärbung	normal
2.	0·5% $Mg(NO_3)_2$	Zellkerne dunkelrot, Plasma farblos	normal
3.	0·5% KNO_3	Kerne etwas schwächer gefärbt; sonst wie 2	normal
4.	0·5% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne tiefrot, stellenweise auch das Plasma	normal; ein Teil der Zellen tot
5.	0·25% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne intensiv gefärbt, Plasma rosa	regelmäßig
6.	0·1% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne noch deutlich gefärbt, vor allem im Parenchym	regelmäßig, feine Protoplasmafäden

Clivia miniata (Blätter).

Wie bei *Agapanthus umbellatus* wurden auch hier bei Verletzung durch Nadelstiche sehr deutliche vitale Kernfärbungen mit Dahliaviolett erzielt.

Auch wurden Schnitte von der oberen Blattepidermis angefertigt und für eine Stunde in verschiedene Erythrosinlösungen gelegt (Ergebnisse siehe Tab. XII und XIII).

Tabelle XIII.

Versuchsdauer 3 Stunden.

	Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
1.	Kontrolle	keine Kernfärbung	regelmäßig
2.	0·0050% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne dunkelrot, Plasma rosa, der ganze Schnitt ist sehr stark gefärbt	Randzellen sind tot, die inneren Zellen normal
3.	0·0025% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne dunkelrot, Plasma farblos	an den Enden zugespitzt, mit Büscheln von Plasmafäden
4.	0·001% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne noch rot, Plasma farblos, schwache Färbung	normal
5.	0·0001% $Al_2(SO_4)_3$	nur sehr vereinzelt gefärbte Kerne; sonst wie 1	regelmäßig

Bei *Agapanthus umbellatus* und *Clivia miniata* tritt eine Kernfärbung ohne Salzzusatz überhaupt nicht ein, höchstens nach vielen Stunden. Die Salze des Mg, K und Al haben einen starken Einfluß auf die vitale Kernfärbung; sie findet in allen Zellen statt. Bei der Färbung mit Dahliaviolett haben die verschiedenen Salzlösungen keine begünstigende Wirkung.

Gymnadenia odoratissima (Blätter).

Zu den Versuchen (Tab. XIV) wurde die Epidermis der unteren Blattseite verwendet. Die Versuchszeit war eine halbe Stunde.

Die Epidermis von *Gymnadenia*-Blättern eignet sich sehr gut für die vitale Kernfärbung; durch Zusatz von $Mg(NO_3)_2$, KNO_3 und $Ca(NO_3)_2$ wird sie sehr gesteigert. Die Färbung mit Dahliaviolett gelingt sehr schön ohne Salzzusatz.

Tradescantia virginica (Blätter).

Es wurde die von der Unterseite der Blätter abgezogene Epidermis verwendet; das Gewebe besteht aus ziemlich gleichmäßigen Zellen, in deren Mitte der Kern, umgeben von stark lichtbrechenden

Tabelle XIV

Farblösung	Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
Erythrosin 1 : 10.000	kein Zusatz	Kerne vereinzelt schwach rosa gefärbt	normal
Erythrosin 1 : 10.000	0·1% $Mg(NO_3)_2$	Kerne intensiv gefärbt, Plasma lichtrosa. Schließzellenkerne lichter gefärbt	regelmäßig
Erythrosin 1 : 10.000	0·1% KNO_3	Kerne rot, Plasma farblos. Schließzellenkerne ungefärbt	normal
Erythrosin 1 : 10.000	0·1% $Ca(NO_3)_2$	Kerne deutlich rot	viele Zellen unplasmolysierbar
Dahliaviolett 1 : 50.000	kein Zusatz	Protoplast beinahe dunkler als der Kern gefärbt	normal
Dahliaviolett 1 : 25.000	kein Zusatz	Kerne dunkelviolett, Plasma ganz licht	regelmäßig

Leukoplasten liegt, ferner aus zahlreichen Spaltöffnungszellen. Bemerkt sei hier, daß die Leukoplasten nur in der lebenden Zelle der Kernhaut anliegen, während sie in toten Zellen im Plasma verstreut sind. Versuche mit Dahliaviolettlösung 1 : 50.000 bei einer Dauer von einer halben Stunde zeigen folgende Resultate (Tab. XV).

Bei *Tradescantia virginica* gelingt in den Epidermiszellen eine deutliche vitale Kernfärbung mit Dahliaviolett; sie wird begünstigt

Tabelle XV.

	Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
1.	Kontrolle	Kerne deutlich blau, Plasma farblos. Schließzellen: Protoplasten blau, Kerne ungefärbt	regelmäßig
2.	0·1% $Mg(NO_3)_2$	Färbung wie bei 1	nicht in allen Zellen regelmäßig
3.	0·1% KNO_3	Kerne bedeutend dunkler gefärbt als bei 1, Plasma sowie Kerne der Schließzellen farblos	regelmäßig
4.	0·1% $Ca(NO_3)_2$	kein Unterschied zu 1	regelmäßig
5.	2% Alkohol	Kerne dunkelviolett, Schließzellenkerne farblos	normal
6.	5% Alkohol	Kerne und Protoplasten blau	nur teilweise plasmolysierbar, teilweise geschrumpft
7.	1% Äther	kein günstiger Einfluß	langsam eingetreten

durch Zusatz von Mg- und K-Salzen und 2% Alkohol. Bei Verwendung von Erythrosinlösung üben nur $Mg(NO_3)_2$- und $Ca(NO_3)_2$-Lösungen eine günstige Wirkung auf die vitale Kernfärbung aus; es tritt aber auch eine kleine Schädigung mancher Zellen ein (siehe Tab. XVI).

Tabelle XVI.

Versuche mit Erythrosin bei einer Dauer von $1^1/_2$ Stunden.

Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
Kontrolle	Kerne leicht rosa, Plasma farblos. Schließzellen farblos	normal
0·5% $Mg(NO_3)_2$	tiefrote Kerne, Plasma lichtrosa	nicht in allen Zellen eingetreten
0·1% KNO_3	Zellkerne ungefärbt	normal
0·1% $Ca(NO_3)_2$	in plasmolysierbaren Zellen dunkelrote Kerne, Plasma farblos, Schließzellenkerne farblos	nur teilweise plasmolysierbar

Echeveria Scheideckeri (Blätter).

Verwendet wurde die Epidermis der Blätter, die sich leicht abziehen läßt; Versuchsdauer war 5 Minuten; Farbstoff: Erythrosinlösung 1 10.000. Ergebnisse sind in Tab. XVII zusammengestellt.

Bei den Epidermiszellen von *Echeveria* war 0·1% die geeignetste Konzentration der Salzlösung; stärkere Salzlösungen fügten vielen Zellen eine merkliche Schädigung zu. Bei Hinzufügen einer 0·25prozentigen $Al_2(SO_4)_3$-Lösung trat die vitale Kernfärbung am kräftigsten ein, wobei das Plasma immer ungefärbt blieb. $NaNO_3$-Lösung, Alkohol und Äther hatten keinen besonderen Einfluß auf die Farbstoffaufnahme der Kerne.

Asplenium viviparum (Blätter).

Die Farne eignen sich im großen und ganzen nicht besonders gut für die vitale Kernfärbung. Denn eine große Anzahl untersuchte ich mit negativem Erfolg: *Didynochlaena lunulatum*, *Nephrodium tenerum*, *Diplazium celtifolium*, *Gymnogramme japonica*, verschiedene *Polypodium*- und *Adiantum*-Arten. Alle diese mußten größtenteils wegen Unfärbbarkeit ausgeschieden werden. Als günstige Versuchsobjekte erwiesen sich zwei *Asplenium*-Arten. Verwendet wurde die Epidermis der Blattunterseite, die aus großen Zellen mit deutlich sichtbaren Kernen besteht, welche außer Chlorophyll noch reichlich Krystallsand führen. Versuchsdauer war eine Viertelstunde. (Ergebnisse wie Tab. XVIII zeigt.)

Durch Hinzufügen einer 0·25prozentigen $Al_2(SO_4)_3$-Lösung trat sehr kräftige vitale Kernfärbung auf, ohne daß den Zellen eine sichtbare

Schädigung zugefügt wurde; Plasma war immer farblos und die Chlorophyllkörner behielten ihre lichtgrüne Farbe. Die vitale Kern-

Tabelle XVII.

	Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
1.	Kontrolle	in einzelnen Zellen lichtrosa Kerne, Plasma farblos	nicht regelmäßig, Protoplasten sehr zerklüftete Formen
2.	0·5% $Mg(NO_3)_2$	nach 5 Minuten: in plasmolysierbaren Zellen stark rot gefärbte Kerne, Plasma farblos. Schließzellenkerne ungefärbt; die angrenzenden Zellkerne lichtrosa. Nach 3 Minuten: intensive Kernfärbung, keine Schädigung der Zellen	großer Teil der Zellen tot; feine Plasmafäden in vielen Zellen. Normal mit zahlreichen Plasmafäden
3.	0·1% $Mg(NO_3)_2$	Kerne etwas lichter gefärbt, Plasma ungefärbt	stark zerklüftete Protoplasten, Plasma teilweise nicht von der Wand abgehoben
4.	0·001% $Mg(NO_3)_2$	schwache Kernfärbung, kaum ein Unterschied zu 1	normal
	0·5% $Ca(NO_3)_2$	viel schwächere Färbung als bei 2	normal, sehr viele Zellen geschädigt
6.	0·25% $Ca(NO_3)_2$	Kerne rot gefärbt	Plasma zerklüftet, viele geschädigte Zellen
7.	0·1% $Ca(NO_3)_2$	Kerne lichrot, Plasma farblos, Zellen nicht geschädigt	regelmäßig
8.	0·5% KNO_3	Kerne dunkelrot gefärbt, doch nicht in allen Zellen	normal
8.	0·25% KNO_3	Kerne deutlich gefärbt	normal
9.	0·1% KNO_3	Kerne nur sehr schwach und vereinzelt gefärbt	normal
10.	0·5% $NaNO_3$	meistens farblos, vereinzelt lichtrosa Kerne	normal
11.	0·25% $Al_2(SO_4)_3$	nach 3 Minuten: in allen Zellen, außer den Schließzellen, intensive Kernfärbung	normal, vollkommen rund
12.	0·1% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne dunkelrot, Plasma farblos; Färbung wie bei 11	normal
13.	0·01% $Al_2(SO_4)_3$	Zellkerne schwächer gefärbt	nicht gleichmäßig abgerundet, Plasmafäden

färbung wurde ferner durch $Mg(NO_3)_2$- und $NaNO_3$-Lösung begünstigt, während bei Zusatz von K- und Ca-Salzen, wie in der bloßen Erythrosinlösung, keine gefärbten Kerne beobachtet werden konnten.

Tabelle XVIII.

	Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
1.	Kontrolle	keine Kernfärbung	regelmäßig
2.	0·5% $Mg(NO_3)_2$	Kerne rosa gefärbt; Plasma und Chlorophyllkörner unverändert; Schließzellenkerne ungefärbt	rund, Protoplast durch zarte Plasmafäden mit der welligen Zellwand verbunden. Depl. möglich
3.	0·5% KNO_3	in einzelnen Zellen Kerne lichtrosa getönt	regelmäßig
4.	0·5% $Ca(NO_3)_2$	keine Kernfärbung	regelmäßig
5.	0·5% $NaNO_3$	Kerne rosa, stärker gefärbt als bei 3	regelmäßig, keine Plasmafäden
6.	0·25% $Al_2(SO_4)_3$	intensive rote Kernfärbung in allen Zellen. Chlorophyllkörner unverändert	regelmäßig, feine Plasmafäden

Asplenium lucidum (Blätter).

Verwendet wurde die Epidermis der Blattunterseite. Tab. XIX zeigt Versuche mit Erythrosinlösung bei einer Dauer von einer Viertelstunde.

Tabelle XIX.

Konzentration des Salzzusatzes	Färbung der Resultate	Plasmolyse
Kontrolle	keine Kernfärbung	normal
0·25% $Al_2(SO_4)_3$	Kerne deutlich rot gefärbt	normal, feine Plasmafäden

Bei allen anderen Salzzusätzen wie KNO_3, $Mg(NO_3)_2$ und $NaNO_3$ trat auch bei längerer Versuchszeit keine Kernfärbung auf. Positiver Erfolg nur durch Hinzufügen einer 0·25prozentigen $Al_2(SO_4)_3$-Lösung. Daraus sieht man deutlich, wie verschieden die lebenden Zellen der einzelnen Pflanzen sich gegenüber der vitalen Kernfärbung verhalten. Dies kann wohl auch als Beweis für das Leben gelten, denn totes Gewebe auch verschiedener Pflanzen zeigt der Farbstoffaufnahme gegenüber sicher ein regelmäßigeres Verhalten.

Tulipa gesneriána (Blütenstengel).

In diesem Falle wurden nicht die Epidermiszellen, sondern die Parenchymzellen, die große, gut sichtbare Kerne haben, mit Erythrosinlösung gefärbt (siehe Tab. XX).

Tabelle XX.

	Konzentration des Salzzusatzes	Zeit	Resultate der Färbung	Plasmolyse
1.	Kontrolle	30'	keine gefärbten Kerne	regelmäßig
2.	$0 \cdot 25\%$ $Al_2(SO_4)_3$	5'	Kerne dunkelrot, Plasma lichtrosa	regelmäßig, Kern manchmal aus dem Plasma herausgetreten oder er liegt an der Grenzschichte
3.	$0 \cdot 5\%$ $Mg(NO_3)_2$	10'	Kerne tiefrot, schwächer als bei 2	regelmäßig
4.	$0 \cdot 5\%$ KNO_3	10'	Kerne rot, Plasma rosa	regelmäßig
5.	$0 \cdot 5\%$ $Ca(NO_3)_2$	30'	keine Kernfärbung	regelmäßig
6.	$0 \cdot 5\%$ $NaNO_3$	30'	keine Kernfärbung	regelmäßig

Mit Dahliaviolett lassen sich bei *Tulipa gesneriána* nur negative Resultate verzeichnen. Das Protoplasma war in allen Zellen violett gefärbt, doch war eine dunklere Färbung des Zellkernes nicht zu beobachten.

Helleborus niger (Blütenstengel).

Längsschnitte durch den Blütenstengel zeigten verhältnismäßig große Parenchymzellen mit leicht sichtbaren Kernen. Die Versuche (Tab. XXI) wurden mit Erythrosin bei einer Dauer von einer Viertelstunde durchgeführt.

Einen begünstigenden Einfluß auf die vitale Kernfärbung bei *Helleborus niger* haben vor allem $Al_2(SO_4)_3$- und $Mg(NO_3)_2$-Lösungen;

Tabelle XXI.

Konzentration des Salzzusatzes	Resultate der Färbung	Plasmolyse
Kontrolle	keine gefärbten Kerne	regelmäßig
$0 \cdot 5\%$ $Mg(NO_3)_2$	Kerne lichtrot, Plasma farblos	regelmäßig
$0 \cdot 5\%$ KNO_3	vereinzelt gefärbte Kerne	regelmäßig, nach 12^h alle Zellen lebend; aber nicht stärker gefärbt
$0 \cdot 5\%$ $Ca(NO_3)_2$	keine Kernfärbung	regelmäßig
0 5% $NaNO_3$	Kerne sehr lichtrosa	regelmäßig
$0 \cdot 5\%$ $Al_2(SO_4)_3$	nach 10 Minuten: Kerne tiefrot, Plasma rosa schattiert	normal; feine Plasmafäden an den Schmalseiten des Protoplasten
Dahliaviolett 1 50.000	Kerne deutlich violett, Plasma farblos	normal

es tritt sehr intensive Färbung der Kerne ein. Bei Dahliaviolett tritt die Färbung ohne Salzzusatz am schönsten ein.

Spirogyra-Arten.

Infolge der Größe oder der Lagerung der Chloroplasten ist bei vielen Algen eine genauere Beobachtung des Zellkernes im Lebendzustande oft nicht leicht. Bei meinen Versuchen gelangten daher nur gewisse *Zygnema*- und *Spirogyra*-Arten, die einen leichten Einblick in die Zelle gestatteten, zur Untersuchung. Bei *Zygnema* konnte ich nie eine vitale Kernfärbung beobachten. *Spirogyra*-Fäden, obwohl äußerst zart und empfindlich, konnten sehr gut zu Färbungen mit Erythrosin verwendet werden. Ergebnisse zeigt Tab. XXII.

Tabelle XXII.

Konzentration des Salzzusatzes	Zeit	Färbung der Resultate	Plasmolyse
Kontrolle	3^h	vollkommen ungefärbt, kein Unterschied zu frischem Material	normal
0·5% $Mg(NO_3)_2$	$1^1/_4{}^h$	breite, doppelbändrige *Spirogyra*: in jungen Zellen Kerne dunkelrot, Kerne und Chromatophoren bereits geteilt, noch keine Zellwand gebildet, andere Kerne nur schwach gefärbt.	normal, gingen aber bald zugrunde
	$^3/_4{}^h$	*Spirogyra* mit einfachem Band: dunkelrote Kerne, Chromatophor in Form und Farbe unverändert	normal, mit Glyzerinlösung durchgeführt
0·5% $NaNO_3$	$1^1/_1{}^h$	beide Arten schön gefärbte Zellkerne, Chromatophor unverändert, Plasma farblos	normal
0·5% KNO_3	7^h	schmalbändrige *Spirogyra*; einzelne licht gefärbte Kerne	normal
0·5% $Ca(NO_3)_2$	7^h	keine Kernfärbung	die meisten Zellen tot

Die Versuche mit Zusatz von $Al_2(SO_4)_3$-Lösung zeigten alle negative Resultate; wegen der Erstarrung des Plasmas konnte auch bei ungefärbten Fäden keine Plasmolyse erreicht werden. Bei Zusatz von $Mg(NO_3)_2$- und $NaNO_3$-Lösung hingegen konnte eine intensive Kernfärbung beobachtet werden. Versuche mit Dahliaviolett ergaben negative Resultate; der Farbstoff wurde von der Zelle wohl aufgenommen, doch trat nirgends eine Färbung des Zellkernes ein.

IV. Anhang.

Einfluß der Temperatur und des Lichtes auf die vitale Kernfärbung.

Die Intensität der Vitalfärbung und die Raschheit ihres Eintrittes ist in besonderem Maße auch von der Temperatur abhängig. Folgende

Versuche in Tab. XXIII zeigen den begünstigenden Einfluß der Wärme; die Versuche wurden im Thermostaten bei 35° C. und in gewöhnlicher Zimmertemperatur bei 17° C. im Dunkeln aufgestellt. Die verwendete Farbstofflösung war Erythrosin.

Tabelle XXIII.

Allium Cepa (Zwiebeln).

	Konzentration des Salzzusatzes	Zeit	° C. Temp.	Resultate der Färbung	Plasmolyse
1.	Kontrolle	2h	35°	Parenchym: intensiv gefärbte Kerne; Epidermis: Kerne farblos	normal
2.	Kontrolle	2h	17°	keine gefärbten Kerne	normal
3.	$0 \cdot 5\%$ KNO_3	1h	35°	Parenchym: deutlich gefärbte Kerne; Epidermis: Kerne lichtrosa	normal
4.	$0 \cdot 5\%$ KNO_3	1h	17°	keine gefärbten Kerne	normal
	$0 \cdot 5\%$ $Mg(NO_3)_2$	1h	35°	Kerne stark rot, intensiver als bei 3	normal
6.	$0 \cdot 5\%$ $Mg(NO_3)_2$	1h	17°	am Rand vereinzelt lichtrote Kerne	normal
7.	$0 \cdot 5\%$ $NaNO_3$	1h	35°	schwächere Färbung als bei 3 und 5	normal
8.	$0 \cdot 5\%$ $NaNO_3$	1h	17°	keine gefärbten Kerne	normal

Auch bei *Agapanthus umbellatus* und *Clivia miniata* konnte ich ähnliche Resultate verzeichnen. Die Zellkerne färben sich bei einer Temperatur von 17° C. in Erythrosinlösung ohne Salzzusatz nicht, während sie bei einer Temperatur von 35° C. schon nach einer Stunde, bei Salzzusatz noch früher, eine intensive rote Färbung annehmen. Die Zellen lassen sich alle normal plasmolysieren. Pflanzen, bei denen durch Salzzusatz keine vitale Kernfärbung erzielt wurde, zeigten auch bei gesteigerter Temperatur keine Farbstoffaufnahme im Zellkern, wie dies bei *Adoxa* untersucht wurde.

Weder diffuses Licht noch direktes Sonnenlicht beeinflußten die vitale Kernfärbung. Die Versuche in Tab. XXIV wurden mit Erythrosin durchgeführt; Plasmolyse zeigte immer normalen Verlauf.

Dieselben Versuche wurden auch mit den Blättern von *Agapanthus umbellatus* und *Clivia miniata* durchgeführt; die Resultate stimmten mit denen von *Allium Cepa* vollkommen überein; kein wesentlicher Färbungsunterschied zwischen Licht und Dunkel, doch eine frühere Schädigung der Parenchymzellen im Lichte. Bei Epidermiszellen von *Asplenium viviparum* trat bei bloßer Erythrosinlösung im Sonnenlichte nach $1^1/_4$ Stunden intensive Kernfärbung ein,

Tabelle XXIV.

Allium Cepa (Zwiebeln).

	Konzentration des Salzzusatzes	Zeit	Beleuchtung	Resultate der Färbung
1.	Kontrolle	1h 2h	diffuses Licht	keine Kernfärbung »
2.	Kontrolle	1h 2h	Sonnenlicht	keine Kernfärbung; am Rand Plasma licht gefärbt, Parenchym geschädigt
3.	Kontrolle	1h 2h	Dunkel	keine Kernfärbung. Parenchym: vereinzelt rosa gefärbte Kerne; Zellen plasmolysierbar
4.	0·5% $Mg(NO_3)_2$	1h 2h	diffuses Licht	Parenchym: Plasma und Kern gefärbt. Intensive Kernfärbung im Parenchym, lichte Kerne in der Epidermis
5.	0·5% $Mg(NO_3)_2$	1h	Sonnenlicht	Kern und Plasma gefärbt. Parenchymzellen nach 2 Stunden tot
6.	0·5% $Mg(NO_3)_2$	2h	Dunkel	kein deutlicher Unterschied zu 4. Färbung eher etwas stärker
7.	0·5% KNO_3	1h 2h	Sonnenlicht	keine Kernfärbung. Alle Zellen tot
8.	0·5% KNO_3	2h	Dunkel	einzelne lichtgefärbte Kerne
9.	0·5% $Ca(NO_3)_2$	1h	Sonnenlicht	alle Zellen tot
10.	0·5% $Ca(NO_3)_2$	2h	Dunkel	einzelne gefärbte Kerne, alle Zellen plasmolysierbar
11.	0·25% $Al_2(SO_4)_3$	1h	Sonnenlicht	Versuch nicht durchführbar, da im Lichte bei Zusatz von Aluminium der Farbstoff ausfällt
12.	Dahliaviolett 1 50.000	1h 2h	diffuses Licht	Keine Kernfärbung. Kerne vereinzelt, Plasma auch gefärbt
		2h	Dunkel	Kerne dunkel, Plasma nur licht gefärbt

doch waren die Zellen nicht mehr plasmolysierbar; im Dunkeln dagegen trat keine Färbung der Kerne ein.

V Diskussion der Resultate.

Durch eine Reihe von Versuchen konnte nun gezeigt werden, daß eine vitale Kernfärbung möglich ist. Wir müssen aber, bevor wir auf die erhaltenen Resultate näher eingehen können, zuerst den Begriff »vital« möglichst enge begrenzen, denn es kommt sehr viel darauf an, was man überhaupt unter vital versteht. Schon Rost hat in seiner Arbeit über vitale Kernfärbung großes Gewicht auf die

Begriffe »lebend« und »tot« gelegt. Da es vom Leben bis zum Tod einen vollständig ununterbrochenen Übergang gibt, so kann man nie sagen, wo der Tod beginnt. Man kann nur den vollendeten Zustand des Todes feststellen dadurch, daß alle fundamentalen Funktionen der lebenden Zelle nicht mehr vorhanden sind. Das Leben aber ist kein begrenzter Zustand, sondern nur die Äußerung einer Reihe aufeinanderwirkender Funktionen, die an noch kleinere Bestandteile der Zelle gebunden sind. Diese können natürlich eine Unmenge von Störungen erfahren, die sich dann rückwirkend als Schädigung der Zelle offenbaren. Infolge solcher ganz geringer Störungen ist eine Zelle oft bereits geschädigt, doch ist sie, da sie noch andere Funktionen ausübt, als lebend zu bezeichnen. Man muß daher, wie Rost meinte, die lebenden Zellen in geschädigte und ungeschädigte Zellen einteilen. Man kann in diesem Falle oft nur schwer eine Grenze ziehen. So zeigen ja Versuche Linsbauer's, daß kernlose Protoplasten noch Plasmolyse eingehen können. Plasmolysierbarkeit ist ausschließlich eine Erscheinung des Lebens, und doch muß man zugeben, daß Zellen ohne Kern als geschädigte zu bezeichnen sind. Es liegt jedenfalls eine Schädigung vor, die nicht den Tod bedingt, da die Permeabilität der Zelle erhalten geblieben ist. Man kann sich ja geschädigte Zellen vorstellen, die in vielen ihrer Lebensäußerungen einer ungeschädigten Zelle vollkommen gleichen. So glaube ich von den gefärbten Zellen bei meinen Versuchen sagen zu können, daß sie sicher leben, was man durch Plasmolyse beweisen kann. Es ist auch höchst wahrscheinlich, daß der Zellkern lebt, doch ist die Annahme nicht von der Hand zu weisen, daß er zumindestens eine Störung seines Zustandes erfahren hat, die ihn befähigt, Farbstoff in reichlicher Menge aufzunehmen. Es wäre dann mit Recht von einer Schädigung der Kerne zu sprechen, wobei sich Schädigung und Leben nicht ausschließen. Es muß ja die Schädigung nicht die ganze Zelle betreffen, sie kann auf den Kern in ganz anderer Weise wirken als auf das Plasma.

Bei den vitalen Kernfärbungen mit Erythrosin und Eosin wurde durch Hinzufügen von Salzlösungen ein begünstigender Einfluß erzielt. Vor allem die Wirkung einer $Mg(NO_3)_2$- und KNO_3-Lösung war äußerst stark, so daß die Annahme naheliegend wäre, es handle sich dabei um eine weitgehende Permeabilitätsveränderung der Plasmahaut; damit im Widerspruch stand aber die Begünstigung der Färbung durch $Ca(NO_3)_2$. Ebenso haben Versuche mit verschieden auf die Permeabilität der Plasmahaut antagonistisch wirkenden Salzlösungen eine bedeutend intensivere Färbung des Kernes und Plasmas gezeigt. Dies läßt sich auch nicht mit einer Permeabilitätsveränderung in Einklang bringen.

Die Lebensdauer der gefärbten Schnitte von *Allium Cepa,* ob in bloßer Erythrosinlösung oder mit Zusatz von Salzlösungen gefärbt, war 3 Tage, manchmal einige Stunden länger oder kürzer. Zwiebelschnitte, mit zweierlei Salzen behandelt, konnten nur einen Tag lebend erhalten werden, was wohl auf die Giftwirkung der Salze

zurückzuführen ist. Die gefärbten Blattepidermiszellen von *Tradescantia virginica, Gymnadenia, Echeveria* waren nur einige Stunden hindurch lebend; aber auch ungefärbte, plasmolysierte Epidermiszellen hatten keine längere Lebensdauer, und so ist der kurze Lebendzustand wohl auf die ganz verschiedene, sicher ungünstige Lebensbedingung, die den Pflanzenzellen geboten wird, zurückzuführen. Eine Ausnahme machten die Epidermiszellen von *Asplenium viviparum* und *lucidum*, die auch nach einem Tag noch vollkommen intakt waren.

Was die Intensität der vitalen Kernfärbung anlangt, so weisen hier die einzelnen Objekte sehr große Unterschiede auf. Oft kommt es nur zu einer zarten Anfärbung oder Tönung, vielfach aber ist die Färbung so intensiv, daß sie der fixierter Kerne gar nicht nachsteht. Die Färbung der Zellkerne ist immer als eine vollkommen diffuse eingetreten. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Versuche von Gicklhorn (2) ganz überein. Doch schreibt er in seiner Arbeit über die Plasmafärbung folgendes: »Das Protoplasma ist ebenso wie der Kern intensiv rot — gleiche Farbe wie die Lösung — und hat weder seine Struktur noch sein glasig durchscheinendes Aussehen geändert.« Bei meinen Versuchen mit *Allium Cepa* hingegen war das Plasma nur ganz licht tingiert, bei den Blattepidermen von *Tradescantia, Gymnadenia, Echeveria* überhaupt farblos. Eine Färbung des Zellsaftes wurde in keinem Falle beobachtet.

Die vitalen, durch Verwundung erzielten Kernfärbungen Küster's brachten Gicklhorn zu der Annahme, daß die Vitalfärbung anscheinend dem Säuregefälle von der Wunde folge. Bei seinen daher mit angesäuerten Lösungen durchgeführten Versuchen erzielte er sehr intensive Kernfärbung. Da aber bei meinen Versuchen nie irgendwie angesäuerte Farbstofflösungen verwendet wurden, muß wohl noch ein anderer Faktor des Wundreizes bei der vitalen Kernfärbung eine Rolle spielen; vielleicht ist auch hier eine kleine Irritation des Kernes die Ursache der auffallend starken Farbstoffaufnahme.

Die Vitalität der gefärbten Zellen wurde durch Plasmolyse und Deplasmolyse geprüft; die Plasmolyseform zeigte immer konvexe Grenzflächen und zeigte keinen Unterschied zu ungefärbten Präparaten. Bei Zusatz von $Mg(NO_3)_2$- und $Al_2(SO_4)_3$-Lösung findet man zahlreiche stärkere und feinere Plasmafäden, an den Schmalseiten des Protoplasten oft büschelartig angeordnet. Bei den langen schmalen Epidermiszellen von *Agapanthus* und *Clivia* tritt oft eine Trennung der Protoplasten ein. Albach schreibt in seiner Mitteilung über vitale Kernfärbung betreffend die Plasmolyse folgendes: »Tritt auch die Plasmolyse nach der Färbung nicht mehr in der Form auf, wie wir sie bei unbehandelten Zellen finden, so spricht sie aber immerhin für das Leben. Während bei der normalen Plasmolyse das Plasma konvexe Grenzflächen ausbildet, so haben wir nach der Farbstoffeinwirkung ein ungleichmäßiges Zurückziehen von der Wand, eine Art Krampfplasmolyse mit konkaven Grenzflächen zu verzeichnen.« Allerdings hatte Albach mit anderen Farbstoffen operiert als ich,

und es ist mit Sicherheit anzunehmen, daß die einzelnen Farbstoffe für sich einen gewissen Einfluß auf die Zelle ausüben können, ohne hiebei offensichtliche Schädigungen oder gar den Tod herbeizuführen. Eine zerklüftete Form der Plasmolyse beobachtete ich bei den gefärbten wie auch ungefärbten Epidermiszellen von *Echeveria Scheideckeri.*

$Al_2(SO_4)_3$-Lösung begünstigt die vitale Kernfärbung kolossal, sogar noch in der äußerst verdünnten Konzentration von 0·0001%. Bei allen Versuchen mit Ausnahme von *Spirogyra* ist regelmäßige Plasmolyse eingetreten. Eine Unplasmolysierbarkeit der Zellen, die Fluri auf eine Permeabilitätserhöhung zurückführte, ist nirgends eingetreten. Scüsz hat ja bewiesen, daß gleichzeitig mit der Unplasmolysierbarkeit auch eine Erschwerung der Verlagerungsfähigkeit eintritt. Er brachte diese Erscheinung mit der Erstarrung des Plasmas in Zusammenhang. Die Erstarrung des Plasmas war die Ursache, warum die Färbungsversuche mit Zusatz von $Al_2(SO_4)_3$-Lösung bei *Spirogyra* nicht durchgeführt werden konnten. Ein besonderes Kennzeichen der Plasmolyse bildeten die zahlreichen feinen Plasmafäden, die bei allen Versuchen mit Ausnahme von *Asplenium* bei Zusatz von $Al_2(SO_4)_3$-Lösung in allen Zellen beobachtet wurden.

Die vitalen Kernfärbungen mit Dahliaviolett sind vor allem bei Blattepidermen und Stengelparenchym sehr gut gelungen. *(Agapanthus, Clivia, Tradescantia, Gymnadenia, Tulipa.)* Der Einfluß der Salze war bei Dahliaviolett ein bedeutend geringerer, in Betracht kam überhaupt nur KNO_3-Lösung, denn auch ohne Salzzusatz trat dunkelblaue Färbung der Kerne ein. Schaede (1), der ebenfalls vitale Kernfärbungsversuche mit Dahlia machte, schreibt: »Vitale Kernfärbung wurde nie gefunden. Bei *Tradescantia virginica* kann sie leicht vorgetäuscht werden, wenn die den Kern einschließende Plasmaschichte gefärbt ist.« Bei meinen Versuchen waren gerade bei den Epidermiszellen von *Tradescantia virginica* die Kerne tiefblau gefärbt, die Leukoplasten dem Kern anliegend — was nur bei der lebenden Zelle der Fall ist — und das Plasma vollkommen farblos, so daß eine Vortäuschung der Färbung unmöglich ist. An anderer Stelle erwähnt Schaede (2) auch, daß Färbungen mit Dahliaviolett und Methylviolett nur bei totem oder sterbendem Plasma stattfinden. Im Gegensatze dazu stehen die erst kürzlich von Albach überprüften vitalen Kernfärbungen von Campbell.

Bei allen Versuchen an Blattgeweben zeigten die Spaltöffnungszellen gegenüber den Farbstoffen ein ganz anderes Verhalten als die übrigen Epidermiszellen. Die Schließzellenkerne waren stets ungefärbt zu einer Zeit, wo die anderen Zellkerne schon eine deutliche Färbung angenommen hatten. Dasselbe beobachtete Linsbauer und stellte fest, daß die Schließzellen langsamer den Farbstoff aufnehmen, aber dann alle übrigen Zellen in der Intensität der Färbung übertreffen; dies ist zurückzuführen auf ihre geringere Permeabilität. Bei einem unversehrten Blatt tritt die vitale Färbung zuerst in den Schließzellen auf, da durch die *Kutikula* der Eintritt der Farbstoffe in die übrigen

Zellen verhindert wird. Ebenso beobachtete Weber bei der Färbung von Blättern von *Zebrina pendula* mit Hilfe der Zentrifugen-Infiltrationsmethode nach wenigen Minuten eine intensive Färbung in den Schließzellen, während die anderen Zellen von der Neutralrotlösung noch nicht tingiert waren. Doch ist dies bei den einzelnen Objekten verschieden.

Durch Verwundung tritt die vitale Kernfärbung bloß am Rande der Wunde auf, ist also auf wenige Zellen beschränkt. Bei der Verwendung von Salzlösungen tritt die vitale Kernfärbung bedeutend stärker und in allen Zellen ein; sie ist im ganzen Schnitt verbreitet. So hat auch höhere Temperatur einen günstigen Einfluß auf die vitale Kernfärbung.

Worin der bedeutende Einfluß der Salzlösungen besteht, der eine vitale Kernfärbung bewirkt, ist nicht sicher festzustellen. Wie durch Versuche gezeigt wurde, besteht wenig Wahrscheinlichkeit, daß eine Permeabilitätsveränderung die Ursache der starken Farbstoffaufnahme sei. Man kommt mehr zu der Ansicht, daß die Färbung auf einer geringen Schädigung der Zellkerne beruhe, die durch verschiedene Salzlösungen, Alkohol, Äther und gesteigerte Temperatur hervorgerufen werde. Es ist dies nicht in dem Sinne gemeint, daß die Zelle daran zu Grunde gehe, sondern eher als vorübergehende Irritation des Kernes. Denn die Vitalität der Zellen wurde ja deutlich durch die Plasmolyse und Deplasmolyse bewiesen. Als Beweis für das Leben des Kernes mag wohl das verschiedene Aussehen gegenüber den Kernen toter Zellen gelten. An anderer Stelle habe ich schon darauf hingewiesen, daß wir uns lebende Zellen vorstellen können, deren Kerne nicht ganz intakt sind, aber dennoch leben. Einen genauen Beweis über den Grad der Vitalität des Zellkernes zu bringen, vermag ich hier nicht, jedoch den, daß das Plasma gegenüber den unbehandelten Zellen sich vollkommen gleich verhält.

VI. Zusammenfassung.

1. Im Anschluß an frühere Untersuchungen anderer Autoren konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, daß eine vitale Kern- und Plasmafärbung bei verschiedenen Pflanzengeweben leicht gelingt.

2. Bei den Färbungsversuchen ergaben Erythrosin, Eosin und Dahliaviolett eindeutige positive Resultate.

3. Die vitale Kernfärbung wird durch Hinzufügen von $Mg(NO_3)_2$-, KNO_3-, $NaNO_3$-, $Ca(NO_3)_2$- und $Al_2(SO_4)_3$-Lösungen zur Farbstofflösung stark begünstigt.

4. Die Färbung der Kerne ist immer eine diffuse und es konnte in keinem Falle eine Bevorzugung irgendwelcher Kernbestandteile bemerkt werden.

5. Auch durch Alkohol und Äther wird die Farbstoffaufnahme der lebenden Zelle gesteigert; vitale Kernfärbung tritt dadurch viel zahlreicher auf.

6. Während die vitale Kernfärbung sich sonst nur auf Zellen in der Nähe von Wundstellen oder des Schnittrandes beschränkt, tritt sie durch Hinzufügen von Salzlösungen sehr intensiv und auch in allen Zellen in gleicher Weise auf.

7. Die Zellen mit vital gefärbten Kernen lassen normale Plasmolyse und Deplasmolyse zu, ein Zeichen, daß die Permeabilität nicht verändert und das Plasma auf jeden Fall nicht wesentlich geschädigt ist.

8. Die Kerne der Schließzellen zeigen im Vergleich mit den Epidermiszellen der Farbstoffaufnahme gegenüber ein ganz verschiedenes Verhalten. Die Färbung der Kerne tritt bedeutend später ein.

9. Auch erhöhte Temperatur hat einen günstigen Einfluß auf die vitale Kernfärbung, während Licht und Dunkel keinen Unterschied hervorrufen.

10. Die angestellten Versuche machen es wahrscheinlich, daß für das Zustandekommen einer vitalen Kernfärbung weniger starke Permeabilitätsveränderungen der Plasmahaut verantwortlich zu machen sind; vielmehr dürfte es sich um eine schwache Schädigung des Zellkernes handeln, der dadurch befähigt wird, Farbstoffe in größerem Ausmaße zu speichern.

VII. Literaturverzeichnis.

Albach W., Über vitale Kern- und Plasmafärbung pflanzlicher Zellen. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., Bd. 44, H. 3, p. 333.

Campbell D., The staining of the living nuclei. Untersuchungen aus dem bot. Inst. zu Tübingen, Bd. 2, H. 3, p. 561, 1888.

Gicklhorn J., 1. Über den Einfluß photodynamisch wirksamer Farbstofflösungen auf pflanzliche Zellen und Gewebe. Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss., math.-nat. Kl., Bd. 133, 1914.
2. Über vitale Kern- und Plasmafärbung an pflanzlichen Zellen. Protoplasma 1927, Bd. 2, p. 1—16.

Fluri M., Der Einfluß von Aluminiumsalzen auf das Protoplasma. Flora 1909, Bd. 99.

Kite G. und Chambers R., Vital staining of chromosomes and the funktion and structure of the nucleus. Science, new Series, Bd. 36.

Küster E., 1. Über die Aufnahme von Anilinfarben in die lebende Zelle. Pringsheim's Jahrb., Bd. 50, p. 261, 1912.
2. Über die Vitalfärbung von Pflanzenzellen. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. 1918, Bd. 35, H. 2, p. 95.
3. Vitale Protoplasmafärbung. Vitale Färbung von Pflanzenzellen. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., 1926, Bd. 44, H. 3, p. 378.

Linsbauer K., Weitere Beobachtungen an Spaltöffnungen. Planta, Archiv f. Bot., Bd. 3, H. 4, 1927.

Overton E., Studien über die Aufnahme von Anilinfarben die lebende Zelle. Pringsheim's Jahrb., Bd. 34, p. 669, 1900.

Pfeffer W., Über die Aufnahme von Anilinfarbstoffen in lebende Zellen. Untersuchungen aus dem bot. Inst. zu Tübingen 1888, Bd. 2.

Przesmycki A. M., Über die intravitale Färbung des Zellkernes und des Protoplasmas. Biol. Zentralblatt, Bd. 17, 1897.

Rost E., Über Kernfärbung an unfixierten Zellen und innerhalb des lebenden Tieres. Pflüger's Archiv f. g. Phys., Bd. 137, 1911.

Ruhland W., 1. Beiträge zur Kenntnis der Permeabilität der Plasmahaut. Pringsheim's Jahrb., Bd. 46, p. 1, 1909.
2. Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. Pringsheim's Jahrb. 1912, Bd. 51, p. 376.

Schaede E., 1. Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarben. Jahrb. f. w. Bot., 1927, Bd. 62, p. 65.
2. Untersuchungen über Zelle, Kern und ihre Teilung am lebenden Objekt. Cohn's Beitr. z. Biol. Pflanze 1925, Bd. 14, H. 2.

Scüsz J., Über einige charakteristische Wirkungen des Aluminiums auf das Protoplasma. Pringsheim's Jahrb., Bd. 52, 1913.

Weber F., 1. Krampfplasmolyse bei *Spirogyra*. Pflüger's Archiv f. g. Phys., Bd. 206, 1924. 2. Vitale Blattinfiltration. Protoplasma 1927, Bd. 1, H. 4.